

О ХАРАКТЕРЕ ДЕЙСТВИЯ И ПРИРОДЕ БАКТЕРИЦИДНОГО ФАКТОРА КИШЕЧНИКА БЛОХ

А. Н. Алексеев, В. А. Бибикова, Н. М. Хрущелевская
и Ж. К. Кантарбаева

Всесоюзный научно-исследовательский институт дезинфекции
и стерилизации Министерства здравоохранения СССР, Москва,
и Среднеазиатский научно-исследовательский противочумный институт,
Алма-Ата

Путем индивидуального дозированного заражения блох *Xenopsylla gerbilli minax* микробами чумы (живыми или убитыми нагреванием) с последующим исследованием насекомых либо на наличие жизнеспособных возбудителей, либо на присутствие зон лизиса на газоне с *M. lysodeikticus* установлено, что желудок блох содержит лизоцим. Бактерицидный эффект, однако, связан не только с наличием лизоцима, но и других — пока неизвестных компонентов, способных быстро обезвреживать грамотрицательные *P. pestis*. Действие бактерицидного фактора облегчается в гипотонической среде с меньшим относительным содержанием крови. *P. pestis*, выращенные при 37°, более чувствительны к действию бактерицидного фактора, нежели культивировавшиеся при 28°.

В наших предыдущих сообщениях (Алексеев, Бибиков, Хрущелевская, 1968, 1969 а, б) было показано, что в кишечнике разных видов блох происходит частичное или полное обезвреживание микробов чумы *Pasteurella pestis*. Уменьшение количества жизнеспособных микробов происходило в течение первых же минут после попадания в блоху и могло быть заторможено путем понижения температуры (Алексеев и др., 1968, 1969а), либо путем предварительного кормления блох взвесью убитых нагреванием микробов (Алексеев и др., 1969 а, б). О выделении от блох лизирующего вещества сообщила и Соколова (1959). В последующем, заражая блох на мыши или через мембрану, Кондрашкина, Кураев и Захарова (1968), показали, что в зараженных блохах как освободившихся, так и, что реже, не освободившихся от микробов чумы в ряде случаев может накапливаться вещество, способное лизировать микробов вакцинного штамма чумы ЕВ на газоне. Там же было высказано предположение, что быстрое обезвреживание возбудителя чумы в наших опытах (Алексеев и др., 1968, 1969а) могло быть связано с гипотоничностью использованной заражающей взвеси. Действительно, для заражения блох мы использовали смесь из равных частей микробов в физиологическом растворе и гемолизированной крови, к 1 мл которой добавляли 9 мл дистиллированной воды. Кровь не приводила к изотоническому состоянию и в отличие от опытов Кондрашкиной с соавторами (1968), где использовали взвесь в соотношении объемов нативной крови и микробной взвеси 1 : 0.5, это соотношение составляло 0.05 : 1. Однако не только уточнение методики проверки действия бактерицидного фактора побудило нас предпринять настоящее исследование.

В последние годы ряд немецких авторов (Malke, 1965; Messner, 1966; Mohrig u. Messner, 1968а, б) усиленно отстаивают мнение о том, что единст-

венным бактерицидным фактором, действующим в организме насекомых, является лизоцим — широко распространенный в животном мире, неспецифический защитный (антибактериальный) фактор. Лизоцим выделен впервые Флеммингом (Flemming, 1922, 1932). Структура и действие его подробно описаны Йеллесом (Joelles, 1964). Лизоцим (мураминидаза) нарушает целостность клеточной стенки главным образом грамположительных бактерий, разрывая в мукополисахаридах оболочек β 1.4-глюкозидную связь N-ацетилмурановой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Известно, что лизоцим *in vitro* не оказывает влияния на микроб чумы (Добрая, 1937; Кишиневский, 1969).

Действие его на грамотрицательные бактерии становится возможным, по всей вероятности, в присутствии каких-либо дополнительных факторов, возможно сходных по эффекту с этилендиаминтетрауксусной кислотой, как в опытах Игон и Карсон (Eagon and Carson, 1965). В связи с изложенным главная цель настоящего исследования состояла в выявлении наличия лизоцима в кишечнике блох и его возможной роли в обезвреживании микробов чумы.

В опытах были использованы самки *Xenopsylla gerbilli minax* на III—IV стадиях переваривания крови, голодавшие до заражения 3—4 суток при 22—24°, и вирулентный штамм чумного микроба 161. Инфицирование блох, как и в более ранних наших работах, производили на аппарате для индивидуального дозированного кормления насекомых по известной методике (Алексеев, 1965; Алексеев, Бибикина и Хрусцелевская, 1967).

Для заражения готовили микробную суспензию с кровью как по старой нашей прописи 1 мл взвеси, содержащей 2 млрд микробных тел вирулентного 161-го штамма чумного микроба с 1 мл гемолизированной крови (соотношение крови и воды для гемолиза 1 : 9), так и по прописи, близкой по составу к используемой Кондрашкиной с соавторами.¹ Количество нативной крови было вдвое большим, нежели микробной взвеси, а сама смесь была приведена к изотоническому состоянию. Для этого к 1 мл крови морской свинки добавляли для гемолиза 4 мл дистиллированной воды, а затем для восстановления изотоничности к 5 мл такой крови добавляли 45 мг стерильной поваренной соли. К полученной смеси добавляли 0.5 мл микробной взвеси в физиологическом растворе, содержащей 5.5 млрд м. т. в этом объеме. Таким образом, количество микробных тел в 1 мл было равно 1 млрд. Кроме того, в качестве дополнительного контроля использовали кровь, гемолиз которой достигался добавлением 9 мл воды к 1 мл крови, но в последующем к 5 мл этой жидкости для получения изотонического раствора добавляли 45 мг соли. Смешиванием 1 мл этой крови с 1 мл двухмиллиардной взвеси микробов получали заражающую смесь, в 1 мл которой находился 1 млрд м. т.

В опытах использовали клетки возбудителя чумы, выращенные как при 37°, так и при 28°. В первом случае блохам таким образом вводили микробы с полным набором детерминант вирулентности для теплокровных, во втором — с неполным. К использованию микробов, инкубированных в разных условиях температуры (28 и 37°), нас побуждала известная разница в их приживаемости в блохах в связи с фенотипическим состоянием бактерий (Бибикина и Классовский, 1968). До и после заражающего кормления блох с целью уточнения количества жизнеспособных м. т. путем титрования методом последовательных разведений брали капилляром пробы из пипетки со взвесью микробов. Зараженных блох растирали в 1 мл бульона Хоттингера, а затем также титровали методом последовательных разведений, высевая на чашки с агаром (с добавлением генциан-виолета) по 0.1 мл жидкости; 0.1 мл исходной взвеси сеяли в бульон. Кроме того, на агаре делали отпечатки пестика, которым растирали блоху.

¹ «Рецепт» этой прописи был составлен по рекомендации и при любезном участии Е. Е. Пунского, за что авторы выражают свою признательность.

Из данных табл. 1 видно, что выраженной статистически достоверной разницы в заражаемости блох в зависимости от тоничности микробной взвеси нет ни в одном случае ($td \leq 2$). Следовательно, освобождение от микробов, как по данным наших предыдущих наблюдений, так и по данным настоящего исследования, не может быть связано с отмиранием микробов только из-за гипотоничности кормовой жидкости, а зависит главным образом от отмирания в результате последующего воздействия среды кишечника и действия его бактерицидного фактора. Сравнение данных о числе инфицированных блох, получавших во взвеси разное количество нативной крови, также показало, что заражаемость блох не зависит существенным образом от этого фактора ($td \leq 2.5$).

Т а б л и ц а 1
Частота выделения микробов в зависимости от свойств кормовой смеси и срока исследования блох

Состав кормовой смеси			Число случаев выделения микробов	Температура инкубации микробов, использованных в кормовой смеси			
кровь: дистиллированная вода	нативная кровь: микробная взвесь	изотоничность смеси		28°		37°	
				часы от заражения до исследования блох *			
				0	3	0	3
1 : 9	0.05 : 1	—	Всего Из них * с числом м. т. 10 ² и более	0.91±0.08 0.33±0.13	0.83±0.11 0.1±0.095	0.82±0.092 0.21±0.105	0.5±0.12 0
		+	Всего Из них * с числом м. т. 10 ² и более	1.0±0.007 0.2±0.012	0.7±0.14 0	0.84±0.084 0.23±0.1	0.2±0.12 0.25±0.21
1 : 4	1 : 0.5	+	Всего Из них * с числом м. т. 10 ² и более	1.0±0.0034 0.53±0.012	0.44±0.16 0.25±0.21	0.81±0.12 0	0.1±0.1 0

Как видно из табл. 1, в которой показано относительное количество случаев обнаружения микробов чумы в искусственно зараженных блохах, число зараженных особей, исследованных через 3 час. после инфицирующего кормления, неизменно снижается независимо от качества заражающей жидкости. И даже при немедленном исследовании после заражения далеко не во всех особях удается выявить жизнеспособных *P. pestis*.

Выживаемость микробов в блохах в зависимости от температуры, при которой выращивали возбудителя, несколько отличается друг от друга и коррелирует с составом кормовой жидкости. Так, если блохам давали микробную взвесь в крови гемолизированной большим количеством воды (1 : 9), лучше выживали те клетки, которые культивировались при 28° (с достоверностью 90 и 95%). Если же отвлечься от статистически достоверно различающихся цифр, то обзор таблицы показывает, что выживаемость микробов в желудке блох почти по всем показателям (заражаемости при исследовании через 0 и 3 час. и в большинстве случаев по числу особей с количеством обнаруженных жизнеспособных микробных тел, превышающим 100) оказывается выше именно тогда, когда для заражения были использованы микробы, выращенные при 28°. Можно предпо-

* Относительный показатель в этом случае вычислен к числу положительных ответов, указанных в предыдущей строке.

ложить, что наличие полного набора детерминант вирулентности не только препятствует действию бактерицидного фактора, но даже несколько облегчает обезвреживание микробов, попадающих в организм блохи с кровью теплокровного.

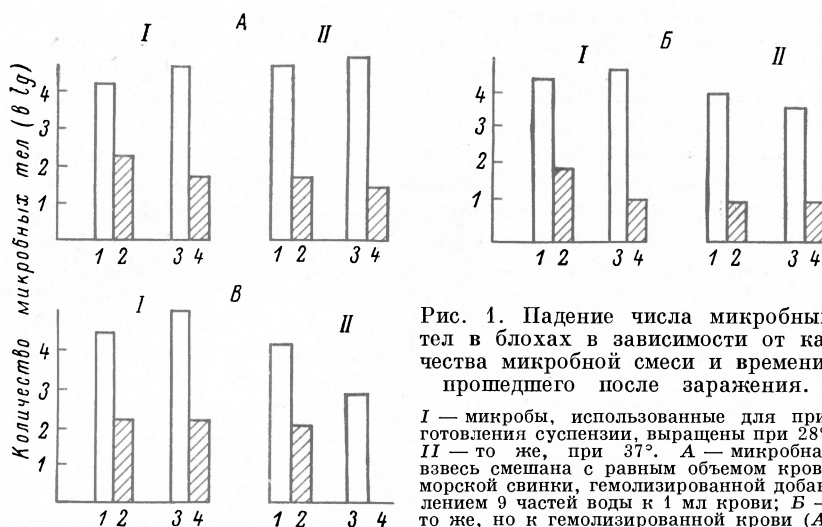


Рис. 1. Падение числа микробных тел в блохах в зависимости от качества микробной смеси и времени, прошедшего после заражения.

I — микробы, использованные для приготовления суспензии, выращены при 28°; II — то же, при 37°. А — микробная взвесь смешана с равным объемом крови морской свинки, гемолизированной добавлением 9 частей воды к 1 мл крови; В — то же, но к гемолизированной крови (А) добавлена соль (NaCl) до получения изотонического раствора; В — взвесь приготовлена из 1 мл крови, 4 мл дистиллированной воды, 45 мг NaCl и 0.5 мл микробной взвеси, содержащей 5.5 млрд микробных тел. 1, 3 — количество микробных тел, полученное блохами при питании взвешью микробов; 2 — количество жизнеспособных микробов, обнаруживаемое в блохах, исследованных сразу после заражающего кормления; 4 — то же, через 3 час. после кормления.

Нами было подсчитано среднее число микробных тел, поглощенных одной блохой, и количество микробов, выделяемое из одной особи, в которой бактерии чумы сохраняли жизнеспособность вплоть до момента исследования. На рис. 1 представлены в виде диаграммы данные о числе микробов до и после заражения. Наглядно видно, что число их падает с тысяч и десятков тысяч до сотен и даже единиц.

Таблица 2

Кратность падения числа микробов в блохах в зависимости от состава заражающей смеси и времени после питания

Состав кормовой смеси			Температура инкубации микробов, использованных в кормовой смеси											
кровь: дистиллированная вода	нативная кровь: микробная взвесь	изотоничность смеси	28°						37°					
			кратность падения числа микробов через											
			0 час.			3 час.			0 час.			3 час.		
			min.	max.	med.	min.	max.	med.	min.	max.	med.	min.	max.	med.
1 : 9	0.05 : 1	— +	10 8	600 1.500	87 70	125 750	11.500 12.500	913 2.600	54 43	15.000 2.000	1.094 738	307 50	10.000 6.000	2656 — *
1 : 4	1 : 0.5	+	50	500	174	106	75.000	567	33	7.500	122	—	—	750 **

В табл. 2 показано во сколько раз падает количество микробных тел в блохах по сравнению с числом поглощенных живых микробов. Исходное количество бактерий во всех опытах, суммированных в табл. 2, превышает тысячу и часто составляет многие десятки тысяч (рис. 1). Оценка выживаемости микробов не только по числу зараженных блох (табл. 1), но и по числу микробов в них (рис. 1, табл. 2) позволяет

* Только два наблюдения, среднего вывести нельзя.

** Единичное наблюдение.

показать, что изотонизация раствора, действительно, в большинстве случаев уменьшает уровень падения числа жизнеспособных микробов в блохах. Как видно из табл. 2, это явление более выражено в тех опытах, где использованы микробы, выращенные при 37°. Возможно, что они, попав в желудок блохи, более чувствительны к нарушению изотонического состояния среды. Сравнение уровней падения числа жизнеспособных микробных тел позволяет выявить преимущества той или иной кормовой смеси. Изготовление кормовой жидкости с более высоким относительным содержанием крови как по отношению к объему входящей в смесь суспензии микробов (1 : 0.5), так и по отношению к объему дистиллированной воды (1 : 4) заметно уменьшает отмирание жизнеспособных микробных клеток, причем это преимущество в их выживаемости сказывается на микробах, выращенных и при 28° и при 37°. Естественно предположить, что в нативной крови действие бактерицидного фактора несколько затруднено.

Т а б л и ц а 3

Кратность падения числа живых микробов в зависимости от первоначально введенного количества и от тоничности кормовой смеси, поглощенной блохами

Количество поглощенных микробных тел	Изотоничность кормовой жидкости	Часы от заражения до исследования блох					
		0			3		
		min.	max.	med.	min.	max.	med.
$3 \cdot 10^2 - 1.5 \cdot 10^3$ {	—	15	500	43	50	100	75
	+	7.5	300	23	4	750	— *
$6 \cdot 10^3 - 8 \cdot 10^4$ {	—	54	15000	1094	307	100000	2656
	+	43	2000	738	50	6000	— *

П р и м е ч а н и е. В этих опытах для изготовления кормовой заражающей смеси использованы микробы, выращенные при 37°.

Уровень снижения числа жизнеспособных микробных тел тем значительнее, чем выше (очевидно, в определенных пределах) исходная заражающая доза. Как видно из табл. 3, при введении тысяч микробных тел уровень снижается в блохах в сотни и тысячи раз, при введении сотен микробов — лишь в десятки, редко — сотни раз.

Как при малых, так и особенно при больших заражающих дозах изотоничность раствора способствует лучшему выживанию микробов. В гипотонической среде выращенные при 37° микробы отмирают более интенсивно. Эти данные говорят о том, что в организме блохи бактерицидный фактор лучше обнаруживает свои литические свойства именно в гипотонической среде. Исходя из данных Малке (Malke, 1965) и Морг и Меснер (Mohrig u. Messner, 1968b) о наличии лизоцима в кишечнике ряда членистоногих, мы повторили их опыты с кишечником блох и газоном из микробов *Micrococcus lysodeikticus*, используемых в качестве тест-объекта для обнаружения лизоцима.

Для проверки наличия и действия лизоцима кишечник блохи IV—V стадии переваривания крови помещали на газон *M. lysodeikticus*, заготовленный за 2—2.5 час. до посева насекомых. Такие блохи служили контролем. Кроме них, использовали и пищеварительный тракт блох, которым предварительно были введены разные количества убитых нагреванием взвесей *M. lysodeikticus* и *P. pestis*. В опытах было более 300 индивидуально накормленных блох.²

Первые же наблюдения подтвердили существование лизоцима в кишечнике блох. Как видно на рис. 2 (I), зона лизиса на газоне *M. lyso-*

* Только два наблюдения, среднее не может быть выведено без существенной ошибки.

² По Дункан (Duncan, 1926) именно наличие крови в желудке кровососов способствует активизации бактерицидного фактора.

deikticus занимает участок диаметром около 3 мм. Зона лизиса вокруг желудка блохи, получившей в виде взвеси 60 тыс. м. т., примерно вдвое меньше (рис. 2, 2), а получивший 120 тыс. м. т. еще вдвое меньше и едва заметна. Мы таким образом, казалось бы, получили прямое подтверждение нашим предыдущим опытам, в которых добились увеличения заражаемости блох путем предварительного введения взвеси убитых нагреванием микробов.

Однако дело, видимо, обстоит сложнее, чем мы полагали; введение блохам грамотрицательных бактерий (*P. pestis*, убитых нагреванием) в количестве 80—100 тыс. (при условии посева желудков в первые часы после кормления блох) практически не дало уменьшения зоны лизиса по сравнению с контролем. Только через сутки пребывания в кишечнике

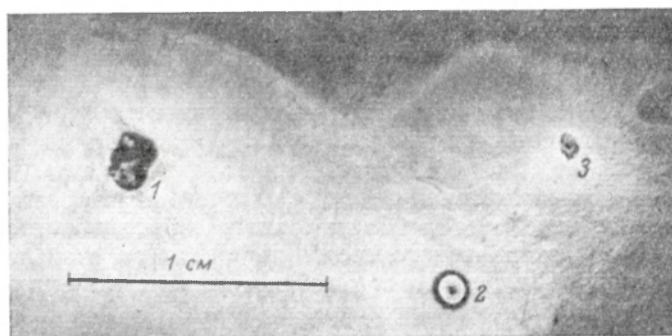


Рис. 2. Зоны лизиса на газоне с *Micrococcus lysodeikticus* вокруг выпрепарированных кишечников блох.

1 — контроль; 2 — вокруг желудка блохи, получившей 60 тыс. м. т., убитых нагреванием; 3 — вокруг желудка блохи, получившей 120 тыс. м. т.

размеры зон лизиса вокруг выпрепарированных через этот срок желудков составили соответственно 2, 0.1, 6 и 0 мм для доз, равных 40, 80, 160 тыс. м. т. (в контроле — зоны лизиса, 3—3.5 мм в диаметре).

Как же согласовать данные об обезвреживании вирулентных клеток возбудителя чумы в первые минуты после заражения с таким замедленным адсорбированием лизоцима, тем более что известно, что лизоцим *in vitro* не действует на грамотрицательные микробы чумы (Flemming, 1922)?

Очевидно, в желудке блох присутствует еще, по крайней мере, один фактор, который способствует действию лизоцима и на грам-отрицательные микробы чумы. В отличие от лизоцима, судя по скорости эффекта, этот фактор в первые минуты (и часы) после контроля с микробами оказывает бактериостатическое действие. По всей вероятности, на первом этапе взаимодействия активны некие ко-факторы (и среди них — бактериостатик), которые в дальнейшем облегчают эффект лизоцима, делают для него возможным адсорбцию на поверхности грам-отрицательных бактерий и литическое воздействие (что мы и наблюдаем через сутки).

Каким образом действуют эти факторы в кишечнике блох — пока остается неясным. Можно только с уверенностью утверждать, что действуют они чрезвычайно быстро — в течение минут — и весьма эффективно, так как кратность снижения числа жизнеспособных бактерий в кишечнике блох в некоторых опытах достигает десятков тысяч раз (табл. 2, 3). А число особей, успевающих полностью обезвредить полученных микробов спустя 3 час. после заражения тысячами и десятками тысяч микробных тел, колеблется в пределах 20—100% (табл. 1). Массивное заражение блох микробами чумы в ряде случаев приводит к их своеобразной «иммунизации» и накоплению обоих факторов (лизоцима

и гипотетического ко-фактора), что делает возможным получение лизиса на газоне из вакцинного штамма возбудителя чумы, как это показала Кондрашкина с соавторами (1969). Явления, которые наблюдаются в этих и наших опытах, по своему механизму, по всей вероятности, сходны с теми, которые наблюдал Стефанс (Stephens, 1959), отметивший нарастание защитной реакции у насекомых, в полость тела которых вводили другой вид грамотрицательных бактерий — *Pseudomonas aguginosa*.

Поскольку лизоцим найден и в кишечнике, и в гемоцеле насекомых (Мориг и Месснер, 1969), имеются основания полагать, что активный в отношении грам-отрицательных бактерий компонент может присутствовать и в кишечнике, и в гемолимфе насекомых. Во всяком случае, основываясь на нашем материале, уже теперь можно утверждать, что бактерицидное действие содержимого кишечника таких кровососов, как блохи, не исключая активности лизоцима, им не исчерпывается и является многокомпонентным.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в кишечнике блох присутствует лизоцим, однако бактерицидное действие содержимого кишечника блох на грамотрицательные микробы *P. pestis* не определяется только его активностью. Необходимо предположение о многокомпонентности бактерицидного фактора и допущение бактериостатического действия одного из компонентов.

2. Нарушение изотонического состояния среды за счет пониженного содержания солей облегчает действие бактерицидного фактора, что говорит в пользу его литически-активной природы.

3. Увеличение концентрации нативной крови в заражающей жидкости лишь незначительно уменьшает активность бактерицидного фактора.

4. Наличие полного набора детерминант вирулентности у микробов чумы, выращенных при 37°, не только не затрудняет, но даже несколько облегчает действие бактерицидного фактора, что сказывается в ускоренном отмирании таких бактерий в кишечнике блох по сравнению с *P. pestis*, выращенными при температуре 28°.

Литература

- Алексеев А. Н. 1965. Принудительное дозированное кормление насекомых. Мед. паразитол. и паразитарн. бол., 4 : 367—471.
- Алексеев А. Н., Бибикова В. А. и Хрусцелевская Н. М. 1967. Методика индивидуального принудительного дозированного заражения блох микробами чумы. Паразитол., 1 (2) : 176—179.
- Алексеев А. Н., Бибикова В. А. и Хрусцелевская Н. М. 1968. Наблюдения за питанием блох в условиях принудительного кормления через капилляр возбудителем чумы. Паразитол., 2 (2) : 115—123.
- Алексеев А. Н., Бибикова В. А. и Хрусцелевская Н. М. 1969а. Некоторые доказательства существования бактерицидного фактора в организме кровососов на примере блох — переносчиков чумы. Паразитол., 3 (3) : 228—235.
- Алексеев А. Н., Бибикова В. А. и Хрусцелевская Н. М. 1969б. К вопросу о бактерицидном факторе желудочно-кишечного тракта блох. Тр. ЦНИДИ, 20 : 367—371.
- Бибикова В. А. и Классовский Л. Н. 1968. О фенотипической изменчивости возбудителя чумы в связи со сменой хозяев. Паразитол., 2 (3) : 209—214.
- Добрая Т. Е. Лизоцим. ВМЭиП, 16 (9—4) : 492—502.
- Кишиневский А. М. 1969. Литиевые сфероласты чумного микроба. Пробл. особо опасн. инф., 2 : 74—78.
- Кондрашкина К. И., Кураев И. И. и Захарова Г. А. 1968. Некоторые вопросы взаимoadaptации чумного микроба с организмом блохи. Паразитол., 2 (6) : 543—547.
- Кондрашкина К. И. 1969. Болеют ли блохи чумой? Пробл. особо опасн. инф., 5 : 212—222.
- Сokolova Н. М. 1959. Выделение от эктопаразитов лизирующего вещества, симулирующего чумной бактериофаг. Тр. инст. «Микроб»; 3 : 93—97.
- Мориг В. и Месснер Б. 1969. Значение лизоцима в антибактериальном иммунитете насекомых. Журн. Общ. Биол., 30 (1) : 62—71.
- Duncan I. 1926. On bactericidal principle present in alimentary canal of Insects and Arachnids. Parasitol., 18 (1) : 238—252.

- Flemming A. 1922. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. Proc. Roy. Soc., Ser. B., 93 : 306—317.
- Flemming A. 1932. Lysozyme. Proc. Roy. Soc. of Med., 26 (2) : 71—84.
- Joellés P. 1964. Neuere Untersuchungen an Lysozymen. Angew. Chem., 76 : 20—28.
- Eagon R. G., a. Carson K. J. 1965. Lysis of cell walls and intact cells of *Pseudomonas aeruginosa* by ethylenediamine tetraacetic acid and by lysozyme. Canad J. Microbiol., 11 : 193—201.
- Malke H. 1965. Über das Vorkommen von Lysozym in Insekten. Z. Allgem. Microbiol., 5 (1) : 42—47.
- Messner B. 1966. Das Lysozymvorkommen in Beziehung zur unspezifischen Immunität der Insekten. Zool. Anz., Suppl., 29 : 511—512.
- Mohrig W. und Messner B. 1967. Lysozym in humoralen Abwehrmechanismus spezifisch und unspezifisch immunisierter Insekten. Biol. Rdsch., 5 : 181—183.
- Mohrig W. und Messner B. 1968a. Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. Biol. Zbl. 87 (4) : 439—470.
- Mohrig W. und Messner B. 1968b. II. Lysozym als antimikrobielles Agens im Darmtrakt von Insekten. Biol. Zbl. 87 (6) : 705—718.
- Stephens J. M. 1959. Immune responses of some insects to some bacterial antigens. Can J. Microbiol., 5 : 203—228.

ON THE CHARACTER OF THE EFFECT AND NATURE OF BACTERICID FACTOR OF THE INTESTINE OF FLEAS

A. N. Alekseev, V. A. Bibikova and N. M. Khrustzelevskaya

S U M M A R Y

By individual dose infection of fleas *Xenopsylla gerbilli minax*, with microbes of plague (alive or killed by heating) and subsequent studies of insects for the presence of viable agents or lysis zones it was established on the layer with *M. lysodeikticus* that the stomach of fleas contains lysozyme. However, the bactericid effect is associated not only with the presence of lysozyme but with other now unknown components which, apparently, are efficient in destroying *P. pestis*. The effect of bactericid factor is facilitated in hypotonic medium with lesser relative blood content. Specimens of *P. pestis* reared at 37° are more susceptible to bactericid factor than those cultivated at 28°.
